

УДК [547.458.2:577.157.2]+587.12

С. В. Горбачова, І. Ф. Бєленічев  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

## ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ ТА $\alpha$ -ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ НА ПОКАЗНИКИ ТІОЛДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу шляхом односторонньої оклюзії сонної артерії викликало виникнення тяжкої неврологічної симптоматики, яка супроводжувалася порушенням тіолдисульфідної рівноваги, активацією процесів окисної модифікації білків та підвищенням рівня білка Hsp 70. Проведення фармакотерапії тіотриазоліном та  $\alpha$ -ліпоєвою кислотою показало здатність препаратів у різні строки експерименту обмежувати дію окисного стресу на нейрональні клітини, яка проявлялася гальмуванням утворення продуктів окисної модифікації білків, зменшенням вмісту окисненого глутатіону та нормалізацією активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Виявлені патобіохімічні ефекти тіотриазоліну та  $\alpha$ -ліпоєвої кислоти зумовлені наявністю в їх структурі тіольної групи, що дозволяє цим препаратам відігравати роль донаторів SH-груп та нормалізувати стан системи глутатіону за умов окисного стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальна церебральна ішемія, тіолдисульфідна рівновага, тіотриазолін,  $\alpha$ -ліпоєва кислота, білок теплового шоку.

ВСТУП. Протягом багатьох років інсульт займає лідируючі позиції серед причин захворюваності, смертності та інвалідизації у світі. На частку ішемічних порушень мозкового кровообігу припадає близько 80 % усіх видів інсульту. На даний час детально вивчено етіологічні чинники і патогенез церебральної ішемії, стали доступними передові методи діагностики [5, 9].

Одним із ключових механізмів пошкодження нервової тканини при порушенні мозкового кровообігу є гіпоксія. Дефіцит кисню за умов ішемії головного мозку призводить до швидкого розладу функціонування прооксидантної і антиоксидантної систем, які в нормі формують стабільний енергетичний гомеостаз. Перспективним у цьому напрямку є вивчення стану антиоксидантної системи, в яку входить цілий ряд сполук, зокрема система глутатіону [7, 8]. Відомості про роль глутатіону при ішемії головного мозку є суперечливими. Так, за даними ряду авторів, зменшення рівня глутатіону підсилює ішемічне пошкодження головного мозку, а підвищення – знижує [3]. З іншого боку, глутатіон може викликати викид глутамату, масивне вивільнення якого призводить до розвитку глутамат-кальцієвого

каскаду і пошкодження нейронів та клітин глії. Основною роллю системи глутатіону є захист клітин від активних форм кисню (АФК), продукція яких значно збільшується при ішемії мозку [6]. Система глутатіону бере участь у реалізації цілого ряду найважливіших фізіологічних процесів: детоксикації та антиоксидантного захисту; біохімічних перетворень вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти та убіхінону; регуляції тіолдисульфідної рівноваги; процесі транспорту амінокислот; підтримці відновного середовища клітини; регуляції вуглеводного, ліпідного, білкового та нуклеїнового обмінів; підтримці оптимального стану і функцій біологічних мембран; обміні ряду ейкозаноїдів – простагландинів та лейкотриєнів. Глутатіон також є резервом цистеїну в клітині й бере участь у реалізації механізмів програмованої клітинної загибелі [4, 10].

Останнім часом з'явилися дані про роль білка теплового шоку Hsp 70 при інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення, що супроводжується порушенням тіолдисульфідної рівноваги, глутаматної ексайтотоксичності. Експресія білка Hsp 70 індукується в клітинах живих організмів у відповідь на дію чисельних стресових факторів, таких, як тепловий шок, гіпоксія, ішемія, метаболічні порушення, вірус-

© С. В. Горбачова, І. Ф. Бєленічев, 2012.

на інфекція, дія фармакологічних агентів. Білок Hsp 70 бере участь у всіх процесах життєдіяльності тканин організму. Імовірно, більшість захисних функцій білка Hsp 70 пов'язана з його шаперонною активністю [13, 16].

Одним із перспективних методів лікування ішемічного інсульту є нейропротекторна терапія з використанням препаратів, спрямованих на метаболічний захист мозку. До таких препаратів з нейропротекторним ефектом належить  $\alpha$ -ліпоева кислота, яка чинить позитивний вплив на енергетичний обмін шляхом активації мітохондріальних ферментів і має антиоксидантну дію [10].

З огляду на це, метою даного дослідження були вивчення стану тіолдисульфідної системи, її корекція тіотриазоліном і  $\alpha$ -ліпоевою кислотою та кореляція виявлених змін з інтенсивністю експресії білка теплового шоку Hsp 70 за умов експериментальної церебральної ішемії.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом необоротної односторонньої оклюзії сонної артерії у монгольських піщанок масою 65–70 г, яких найчастіше використовують для моделювання порушення мозкового кровообігу. Всі експериментальні процедури проводили згідно з Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях. Піщанок виводили з експерименту під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) внутрішньочеревно [11].

Кожного дня з 1-ї до 4-ї доби у тварин оцінювали вираження неврологічного дефіциту за шкалою С. Р. McGrow [15]. Тяжкість стану визначали за сумою відповідних балів, відмічали парези, паралічі кінцівок, тремор, маневні рухи, птоз, положення на боці, рухливість, як прояв неврологічного дефіциту розглядали утримування піщанок на стержні діаметром 15 см, що обертається зі швидкістю 3 об./хв. Біохімічні дослідження головного мозку проводили через 24 год та на 4 добу ішемії. Для цього збагачену фракцію нейронів шляхом диференційованого ультрацентрифугування розділяли на дві фракції – цитозольну і мітохондріальну. Центрифугування проводили при 60 000 g у рефрижераторній центрифугі Centrifuge 5804R ("Eppendorf", Німеччина). В отриманих цитозольній і мітохондріальній фракціях спектрофотометрично досліджували відповідні показники. Концентрацію відновленого й окисненого глутатіону визначали в депротейнізованому цитозолі флуориметричним методом з реєстрацією показників на флуо-

риметрі Hitachi MPF-4 (Японія). Як флуоресцентний реагент використовували о-фталевий альдегід ("Sigma", США). Активність глутатіонредуктази (ГР) оцінювали за споживанням NADPH ("Sigma", США), а глутатіонпероксидази (ГПП) – за швидкістю окиснення NADPH у зв'язаній глутатіонредуктазній системі [1, 2]. У гомогенаті кори біохімічними методами визначали вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) за рівнем альдегідних (АФГ) та карбоксильних (КФГ) продуктів ОМБ за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразіном [14].

Концентрацію в тканинах головного мозку білка Hsp 70 визначали методом Вестерн-блот-аналізу. Білки розділяли в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенесення білків з ПААГ на мембрану нітроцелюлози здійснювали шляхом електроелектролізу протягом 45 хв. Передінкубацію Вестерн-блотів проводили в розчині TBST з 5 % знежиреним молоком протягом 1 год. Потім Вестерн-блоти інкубували за присутності первинних моноклональних антитіл (Santa Cruz Biotechnology) проти HSP у розведенні 1:1000 протягом 1 год. Після відмивання блоти інкубували за наявності вторинних антитіл (Santa Cruz Biotechnology), кон'югованих з пероксидазою хрому (розведення 1:2000), упродовж 1 год. Детекцію HSP здійснювали за допомогою денситометрії в програмі "Adobe Photoshop" [12].

Статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Стюдента. Результати аналізу показників вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Моделювання експериментальної церебральної ішемії призводило до інтенсифікації ОМБ, що підтверджувалось накопиченням альдегідних та карбоксильних продуктів у тканинах головного мозку експериментальних тварин. Концентрація альдегідфенілгідразонів (АФГ) як ранніх маркерів пошкодження білкових молекул через 24 год від початку оклюзії сонної артерії підвищувалася в 3,1 раза порівняно з псевдооперованими тваринами. Накопичення кетонфенілгідразонів (КФГ) як найбільш токсичних продуктів окисного пошкодження білків на 4 добу експерименту свідчило про високу інтенсивність окисного стресу в тканинах головного мозку. Величина КФГ у цей термін експерименту досягала 1,8 у. о., що в 6,2 раза перевищувало аналогічний показник псевдооперованих тварин (табл. 1).

При проведенні аналізу стану тіолдисульфідної системи за умов експериментальної

церебральної ішемії було виявлено як тяжкі порушення вмісту окиснених та відновлених форм глутатіону, так і зниження активності ключових ферментів вказаної антиоксидантної системи – глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Тенденція до зменшення концентрації відновленої форми глутатіону та активності ферментів одночасно з підвищенням активності процесів окисної модифікації білків свідчила про виснаження антиоксидантних систем нервової тканини при церебральній патології. Так, у тварин контрольної групи в гомогенаті тканин головного мозку через 24 год після моделювання гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) було зареєстровано зниження активності ГПР на 64,4 %, а активності ГР – на 75 %, яке відбувалося паралельно з накопиченням окисненого глутатіону (табл. 2, 3). У ході біохімічних досліджень на 4 добу експерименту встановлено подальше виснаження вмісту відновленої форми глутатіону та накопичення його окисненої

форми, що відбувалося на фоні подальшого зниження активності антиоксидантних ферментів (ГПР, ГР).

Проведення фармакотерапії тіотриазоліном та  $\alpha$ -ліпоевою кислотою показало здатність препаратів у різні строки експерименту обмежувати дію окисного стресу на нейрональні клітини, яка проявлялася гальмуванням утворення продуктів окисної модифікації білків, зменшенням вмісту окисненого глутатіону та нормалізацією активності ГПР та ГР. Підвищення активності вказаних ферментів може свідчити про захист нейронів від активних форм кисню і продуктів окисної модифікації та пероксидації за умов церебральної ішемії, що дозволяє певною мірою відновити тіолдисульфідну рівновагу. Виявлені патобіохімічні ефекти тіотриазоліну та  $\alpha$ -ліпоевої кислоти зумовлені наявністю в їх структурі тіольної групи, що дозволяє цим препаратам відігравати роль донаторів SH-груп та нормалізувати стан системи глутатіону при окисному стресі.

Таблиця 1 – Показники окисної модифікації білків у мозку тварин у різні терміни церебральної ішемії

Група тварин	Продукти ОМБ, у. о./г білка			
	АФГ (270 нм)		КФГ (363 нм)	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	0,45±0,05	0,41±0,03	0,25±0,03	0,29±0,04
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	1,4±0,035	2,1±0,04	0,56±0,03	1,8±0,08
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	0,72±0,02*	1,3±0,03*	0,34±0,01*	0,82±0,12*
Тварини з ГПМК+ $\alpha$ -ліпоева кислота (n=7)	0,74±0,03*	1,42±0,02*	0,36±0,01*	0,95±0,16*

Примітка. Тут і в наступних таблицях: \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи тварин з ГПМК.

Таблиця 2 – Активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази в тканинах мозку тварин з ГПМК

Група тварин	ГПР, мкмоль/мг білка/хв		ГР, мкмоль/г білка/хв	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	68,9±4,8	61,2±4,6	15,1±1,1	12,8±0,78
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	24,5±3,1	15,3±2,6	6,0±0,95	4,7±0,62
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	45,6±3,9*	37,5±1,5*	10,4±0,88*	7,5±0,86
Тварини з ГПМК+ $\alpha$ -ліпоева кислота (n=7)	42,3±3,2*	35,9±3,3*	10,3±0,9*	7,3±1,2

Таблиця 3 – Стан системи глутатіону в тканинах мозку тварин з ГПМК

Група тварин	Глутатіон відновлений		Глутатіон окиснений	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	3,1±0,07	2,95±0,05	0,12±0,02	0,14±0,02
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	0,54±0,03	0,26±0,04	0,9±0,07	1,65±0,04
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	1,8±0,06*	1,45±0,02*	0,61±0,06*	0,82±0,05*
Тварини з ГПМК+ $\alpha$ -ліпоева кислота (n=7)	2,0±0,05*	1,52±0,03*	0,63±0,05*	0,79±0,04*

**ВИСНОВКИ.** Моделювання ГПМК шляхом односторонньої оклюзії сонної артерії викликало виникнення тяжких неврологічних порушень у 100 % контрольних тварин (на 4 добу спостерігався середній бал 11,4). У дослідних групах, які отримували експериментальну терапію

тіотриазоліном та  $\alpha$ -ліпоевою кислотою, тварин з тяжкою симптоматикою було достовірно менше, ніж у контрольній, і вірогідно знижувалась їх летальність на фоні ГПМК (табл. 4).

Слід відзначити позитивну динаміку відповідних біохімічних показників на тлі викорис-

Таблиця 4 – Розвиток неврологічного дефіциту тварин з ГПМК та вміст білка Hsp 70

Група тварин	1 доба		4 доба		Кількість тварин, які вижили, на 4 добу, %
	Середній бал	Hsp 70, у. о. білка	Середній бал	Hsp 70, у. о. білка	
Псевдооперовані тварини (n=10)	1,9±0,6	15,6±0,41	2,00±0,5	15,5±0,36	100
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	9,2±1,2	16,9±0,38	11,4±3,00	16,4±0,44	30
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	6,4±0,8	24,4±0,33*	7,33±0,44	22,7±0,28*	60
Тварини з ГПМК+α-ліпоєва кислота (n=7)	6,8±1,5	19,8±0,4*	7,7±1,77	18,3±0,31	70

тання тіотриазоліну, який майже в 1,8 раза знижував виникнення неврологічної симптоматики та летальності, переважаючи за ними α-ліпоєву кислоту. Аналіз неврологічної симптоматики та дослідження вмісту білка Hsp 70 виявили кореляцію цих показників. Встановлено, що у тварин з високим балом неврологічного дефіциту за шкалою Р. McGrow вміст Hsp 70 більш низький. Підвищення концентрації білка Hsp 70, на нашу думку, пов'язане з його шаперонною активністю за умов окис-

ного стресу, яка спрямована на захист білкових молекул та посилення адаптаційних можливостей нервової тканини при церебральній ішемії. Пов'язуючи ці дані з результатами біохімічних досліджень стану тіолдисульфідної системи, можна стверджувати, що білок Hsp 70 позитивно впливає на синтез та активність антиоксидантних ферментів. Ці дані узгоджуються з результатами зарубіжних досліджень, в яких показано нейропротекторну активність Hsp 70 за умов гіпоксії [16, 17].

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 739 с.
- Беленічев І. Ф. Продукти вільнорадикального окиснення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.
- Верлан Н. В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии : дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2008. – 210 с.
- Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии / Э. Г. Горожанская, В. Б. Ларионова, Г. Н. Зубрихина // Рос. онкол. журн. – 2002. – № 5. – С. 29–32.
- Гусев Е. И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов // Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С. 44–48.
- Изучение системы глутатиона у больных с хронической церебральной ишемией / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, В. В. Шпрах [и др.] // Паллиативная медицина и реабилитация : Научно-практич. журн. – 2004. – № 2. – С. 40–41.
- Коржов В. И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В. И. Коржов // Журн. Академії медичних наук України. – 2007. – **13**, № 1. – С. 3–19.
- Острая церебральная недостаточность / В. И. Черный, В. Н. Ельский, Г. А. Городник, А. Н. Колесников. – Донецк : ООО “ИПП “Промінь”, 2007. – 514 с.
- Румянцева С. А. Патологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга / С. А. Румянцева, В. В. Афанасьев, Е. В. Силина // Журн. неврол. и психиатрии. – 2009. – № 3. – С. 64–68.
- Система глутатиона крови при цереброваскулярных заболеваниях и коррекция нарушений ее функций α-липоевой кислотой / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, В. В. Бардымов [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2006. – № 3. – С. 34–38.
- Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації. – К.: Авіцена, 2002. – 527 с.
- Avrames S. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies / S. Avrames, T. Termynck // Mol. Immunol. – 1993. – **30**. – P. 119–127.
- Downstream caspases are novel targets for the anti-apoptotic activity of the molecular chaperone Hsp 70 / E. Y. Komarova, E. A. Afanasyeva, M. M. Bulatova [et al.] // Cell Stress & Chap. – 2004. – № 9. – P. 265–275.
- Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Oxford Press. – 1999. – № 2. – P. 248.
- McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – **34**, № 6. – P. 334–336.

16. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones / R. I. Morimoto, M. P. Kline, D. N. Bimston, J. J. Cotto // Essays Biochem. – 1997. – 32. – P. 17–29.

17. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp 70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury / J. C. Plumier, A. M. Krueger, R. W. Currie [et al.] // Cell Stress Chaperones. – 1997. – № 2. – P. 162–167.

**С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев**  
ЗАПОРІЖСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ

## **ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА И $\alpha$ -ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

### **Резюме**

Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения путем односторонней окклюзии сонной артерии вызывало возникновение тяжелой неврологической симптоматики, которая сопровождалась нарушением тиолдисульфидного равновесия, активацией процессов окислительной модификации белков и повышением уровня белка Hsp 70. Проведение фармакотерапии тиотриазолином и  $\alpha$ -липоевой кислотой показало способность препаратов в разные сроки эксперимента ограничивать действие окислительного стресса на нейрональные клетки, что проявлялось торможением образования продуктов окислительной модификации белков, уменьшением содержания окисленного глутатиона и нормализацией активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Выявленные патобиохимические эффекты тиотриазолина и  $\alpha$ -липоевой кислоты обусловлены наличием в их структуре тиольной группы, что позволяет этим препаратам выступать в роли донаторов SH-групп и нормализовать состояние системы глутатиона в условиях окислительного стресса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** экспериментальная церебральная ишемия, тиолдисульфидное равновесие, тиотриазолин,  $\alpha$ -липоевая кислота, белок теплового шока.

**S. V. Horbachova, I. F. Bielenichev**  
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## **INFLUENCE OF THIOTRIAZOLINE AND $\alpha$ -LIPOIC ACID ON MARKERS OF THIOL-DISULFIDE SYSTEM UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA**

### **Summary**

Modeling of acute damage of brain circulation by way of unilateral occlusion of carotid artery causes arising of severity neurological symptomatic, which was accompanied by damaging of thiol-disulfide equilibrium, activation of processes of protein oxidative modification and increasing of level of protein Hsp 70. Conduction of pharmacotherapy with thiotriazoline and  $\alpha$ -lipoic acid showed ability of preparations to limit an action of oxidative stress on neuronal cells on different terms of experiment, what was shown on braking of protein oxidative modification products formation, decreasing of oxidative glutathione content and normalization of GPR and GR activity. Pathobiochemical effects of thiotriazoline and  $\alpha$ -lipoic acid, which were revealed, stipulated by presence in their structure thiol-group, that allows to these preparations to be in role of SH-groups donators and to normalize state of glutathione system under conditions of oxidative stress.

**KEY WORDS:** experimental cerebral ischemia, thiol-disulfide equilibrium, thiotriazoline,  $\alpha$ -lipoic acid, heat-shock proteins.

Отримано 08.02.12

Адреса для листування: С. В. Горбачова, Запорізький державний медичний університет, вул. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.